

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

19

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-72766

(P2000-72766A)

(43) 公開日 平成12年3月7日 (2000.3.7)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	P I	テマコード (参考)
C 0 7 D 311/58		C 0 7 D 311/58	4 B 0 6 4
A 6 1 K 31/35	ABE	A 6 1 K 31/35	4 B 0 6 5
	ABG		4 C 0 6 2
	ABN		4 C 0 8 6
	ACD		ACD

審査請求 未請求 請求項の数10 F D (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-256095

(22) 出願日 平成10年8月27日 (1998.8.27)

(71) 出願人 000002831

第一製薬株式会社

東京都中央区日本橋3丁目14番10号

(71) 出願人 000001915

メルシャン株式会社

東京都中央区京橋1丁目5番8号

(72) 発明者 河村 直人

神奈川県大和市中央林間6-2-1 ヴェ

ルデ中央林間207号

(72) 発明者 辻 恵美子

神奈川県藤沢市辻堂7053

(74) 代理人 100060782

弁理士 小田島 平吉 (外2名)

最終頁に続く

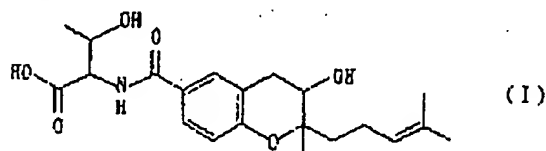
(54) 【発明の名称】 ベンゾピラン誘導体

(57) 【要約】

【課題】 ICAM-1/LFA-1 結合阻害作用を有するベンゾピラン誘導体の提供。

【解決手段】 ストレプトミセス (Streptomyces) の培養により得ることのできる下記式 (I) で示される化合物:

【化1】



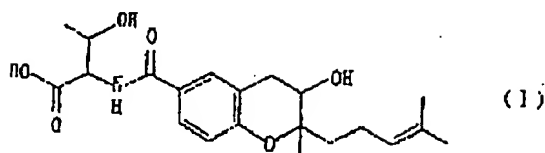
上記化合物の微生物の培養による製造方法、および上記化合物を有効成分として含有する医薬。

(2) 開2000-72766 (P2000-7274)

【特許請求の範囲】

【請求項1】 次式

【化1】



で表されるベンゾピラン誘導体、そのエステル誘導体、該両誘導体の塩、ならびに該両誘導体および塩の水和物から選ばれる化合物。

【請求項2】 請求項1記載のベンゾピラン誘導体の製造方法であって、該誘導体を生産しうる能力を有するストレプトミセス (*Streptomyces*) 属に属する微生物を栄養培地で培養し、該培養培地または該菌体から該誘導体を回収することを特徴とする方法。

【請求項3】 ストレプトミセス (*Streptomyces*) 属に属する微生物がストレプトミセス Mer-88 (FERM P-16829) である、請求項2記載の製造方法。

【請求項4】 式(1)で表されるベンゾピラン誘導体、そのエステル誘導体、該両誘導体の塩、ならびに該両誘導体および塩の水和物から選ばれる化合物を有効成分として含有する、ICAM-1とLFA-1との結合阻害剤。

【請求項5】 式(1)で表されるベンゾピラン誘導体、そのエステル誘導体、該両誘導体の塩、ならびに該両誘導体および塩の水和物から選ばれる化合物を有効成分として含有する、ICAM-1阻害剤またはLFA-1阻害剤。

【請求項6】 式(1)で表されるベンゾピラン誘導体、そのエステル誘導体、該両誘導体の塩、ならびに該両誘導体および塩の水和物から選ばれる化合物を有効成分として含有する、ICAM-1の結合またはLFA-1の結合に随伴する疾患の予防剤又は治療剤。

【請求項7】 式(1)で表されるベンゾピラン誘導体、そのエステル誘導体、該両誘導体の塩、ならびに該両誘導体および塩の水和物から選ばれる化合物を有効成分として含有する、ICAM-1とLFA-1の結合形成に随伴する疾患の予防剤または治療剤。

【請求項8】 該疾患が、喘息又はリウマチである請求項記載の予防剤または治療剤。

【請求項9】 式(1)で表されるベンゾピラン誘導体、そのエステル誘導体、該両誘導体の塩、ならびに該両誘導体および塩の水和物から選ばれる化合物を有効成分として含有する、医薬。

【請求項10】 式(1)で表されるベンゾピラン誘導体の生産能を有するストレプトミセス (*Streptomyces*) のある種に属する微生物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、微生物の生産するベンゾピラン誘導体、ならびにその製造方法および医薬としての用途に関する。

【0002】

【従来の技術】生体内では、機能を異にする細胞が相互作用しながら恒常性の維持に関わっている。接着分子は細胞と細胞あるいは細胞と細胞外基質との接着を担う分子である。これまでに多くの接着分子が同定され、モノクローナル抗体の利用によってその機能も明らかにされている。接着分子はセレクチン (L.E.C.A.M) ファミリー、イムノグロブリン (Ig) スーパーファミリー、インテグリンスーパーファミリー、カドヘリンスーパーファミリー等に分類されている。

【0003】これらの接着分子のうちICAM-1 (細胞間接着分子1, Intercellular Adhesion Molecule-1) は、LFA-1 (リンパ球機能抗原1, Lymphocyte function-associated Antigen-1) が接着するカウンター分子 (リガンド) として発見された膜糖タンパク質である。ICAM-1は血管内皮細胞、抗原提示細胞、繊維芽細胞、気管上皮細胞および活性化白血球等に発現し、インターロイキン1 (IL-1) や腫瘍壊死因子 (TNF) 等の炎症性サイトカインにより発現量が有意に増加することが知られている。さらに、ヒトの慢性関節リウマチ、自己免疫性甲状腺炎等の炎症局所で発現が高まっていること等により、炎症の進展にICAM-1が重要な役割を担っているといわれている。また、中和抗体を用いた検討からICAM-1とLFA-1の接着経路が関節炎、虚血再灌流障害、糸球体腎炎、喘息における気道過敏症などの炎症反応に深く関与し、また、上記接着の阻害が上記疾患の亢進を抑制しうることも示唆されている。

【0004】したがって、上記疾患の治療に有用な医薬を提供すべく、ICAM-1の産生を阻害する物質が提案されている (例えば、特開平10-130240号)。一方、ICAM-1とLFA-1の接着 (または結合) を阻害する物質も上記疾患の治療に有用である可能性が高い。かような物質の代表的なものとして各種疾患モデル動物での効果が認められているのは、ICAM-1に対する抗体が挙げられる (後述の文献1~11参照)。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、上記のようなICAM-1とLFA-1の接着経路に有意に作用しうる化合物として、ICAM-1に対する抗体のごとく高分子量物質とは異なり、比較的低下量の化合物を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記各種疾患モデル動物を用いるイン・ビボ系における被検物質

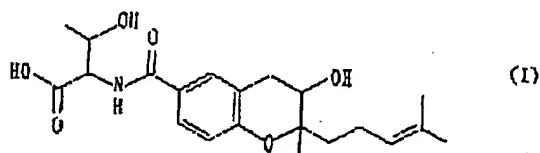
(3) 開2000-72766 (P2000-7274)

の評価と良好な相関性を示す。ICAM-1とLFA-1との(以下、ICAM-1/LFA-1ともいう)結合阻害作用のイン・ビトロ評価系(後述の実施例参照)により、微生物の生産物について広範囲にスクリーニングしてきた。その結果、ストレプトミセス(*Streptomyces*)属に属する一菌株の生産する化合物が、ICAM-1/LFA-1結合阻害作用を示すことを見出した。また、本発明者らが知り得る限りでは、かような化合物それ自体は、従来技術文献に未載の新規化合物であることも確認した。

【0007】したがって、本発明は、式(1)

【0008】

【化2】



【0009】で表される新規ベンゾピラン誘導体、そのエステル誘導体、該両誘導体の塩、ならびに該両誘導体および塩の水和物を提供する、上記式(1)の化合物ベンゾピラン誘導体(以下、ベンゾピラン誘導体という)は、優れたICAM-1/LFA-1結合阻害を示すことから、該誘導体、そのエステル誘導体、該両誘導体の塩、ならびに該両誘導体および塩の水和物から選ばれる化合物(以下、本発明の化合物ともいう)の一種以上を有効成分とするICAM-1とLFA-1との結合阻害剤、ICAM-1またはLFA-1の阻害剤、ならびにICAM-1とLFA-1との結合形成に随伴する各種疾患の予防剤または治療剤も、別の態様の本発明として提供される。

【0010】さらにまた、ベンゾピラン誘導体は、ストレプトミセス(*Streptomyces*)属に属する微生物を栄養培地で培養することにより、効率よく製造できるので、かような製造方法も、さらに別の態様の本発明として提供される。

【0011】上記のように、ベンゾピラン誘導体は、ICAM-1/LFA-1結合阻害活性を有するので、ICAM-1/LFA-1接着経路を解明するための生化学または薬理学的試薬として、また、上記のごとく、喘息、リウマチ等の炎症性疾患の予防もしくは治療用化合物としての有用性がある。

【0012】

【発明の具体的な態様】ベンゾピラン誘導体は、上記式(1)で表されるとおり、分子中に遊離のカルボキシル基を有している。したがって、本発明の目的に沿う限り、塩またはエステルとしても提供できる。かような塩としては、場合によって医薬の有効成分として用いる際に有用である。例えばリチウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、マグネシウム塩、カルシウ

ム塩等のアルカリ土類金属塩、アンモニウム塩、またトリエチルアミン塩やN-メチルグルカミン塩、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン塩等を挙げる事ができる。一方、エステルは、本発明の化合物を合成中間体やプロドラッグとして用いるのに有用であり、前者として用いる場合、例えば、アルキルエステル類やベンジルエステル類、アルコキシアルキルエステル類、フェニルアルキルエステル類およびフェニルエステル類等を好ましいものとして挙げる事ができる。また、後者として用いる場合には、例えば、アセトキシメチルエステル、ヒバロイルオキシメチルエステル、エトキシカルボニルエステル、コリンエステル、ジメチルアミノエチルエステル、5-アルキル-2-オキソ-1,3-ジオキサール-4-イルメチルエステル、3-アセトキシ-2-オキソブチルエステル等のオキソアルキルエステル等を好ましいものとして挙げる事ができる。

【0013】また、本発明によれば、ベンゾピラン誘導体は分子中に第二級水酸基を2個有しており、これらの少なくとも1個を介して形成されるカルボン酸エステルも提供される。カルボン酸は脂肪酸、脂環式、芳香族カルボン酸のいずれに属するものであってもよい。

【0014】上記の本発明に係るベンゾピラン誘導体は、該誘導体の生産能を有するストレプトミセス(*Streptomyces*)属に属する微生物の培養による発酵法で製造することができる。

【0015】使用できる微生物の代表的な菌株としては、土壌より分離された放線菌であって、エムイーアル・88(Mer-88)と番号を付した菌株を挙げる事ができる。このMer-88菌株は、下記の菌学的性状からストレプトミセス(*Streptomyces*)属の菌と考えられている。

【0016】(1)形態

よく伸長した基生菌糸より螺旋状(spirales)あるいはコイル状(retinaculaperti)の気中菌糸を伸長する。成熟した気中菌糸の先に10個~50個の円筒形の胞子からなる胞子鎖を形成する。胞子のうは認められない。胞子の大きさは0.5×0.7~1.0ミクロン位で、胞子の表面は平滑状(smooth)あるいはしわ状(rugose)を示し、鞭毛は認められない。

(2)各種培地における生育状態

培養は全て28℃で行った。色調の記載はコンティナー・コーポレーション・オブ・アメリカのカラー・ハーモニー・マニュアル(Conluner Corporation of AmericaのColor Harmony Manual)の( )内に示す符号で表示する。

【0017】1) イースト・麦芽寒天培地

生育は良好で、その表面に気中菌糸を着生し、灰色系(4ig~5fc)の胞子が見られる。培養表面は黒色である。茶色の溶解性色素を産生する。

(4) 開2000-72766 (P2000-7274)

## 【0018】2) オートミール寒天培地

生育は弱く、その表面に気中菌糸を多少着生し、灰色系(5fe)または赤色系(5dc)の胞子が見られる。培養表面はうす茶色である。溶解性色素は産生しない。

## 【0019】3) スターチ・無機塩寒天培地

生育は中程度で、その表面に気中菌糸を多少着生し、灰色系(5fe)の胞子が見られる。培養表面は黒色である。黒色の溶解性色素を多少産生する。また、澱粉は消化しない。

## 【0020】4) グリセリン・アスパラギン寒天培地

生育は良好で、その表面に気中菌糸を着生し、灰色系(5fe)の胞子が見られる。培養表面は黒色で、茶色の溶解性色素を産生する。

## 【0021】5) チロシン寒天培地

生育は非常に弱く、気中菌糸を産生しない。培地中にメラニン性色素は生成しなかった。

## 【0022】(3) 各種炭素源の同化性

ブリードハム・ゴトリブ寒天培地に各種の炭素源を加え生育を見た。

## 【0023】

- |             |   |
|-------------|---|
| 1) L-アラビノース | - |
| 2) D-キシロース  | - |
| 3) D-グルコース  | + |
| 4) D-フルクトース | + |
| 5) シュクロース   | + |
| 6) イノシトール   | - |
| 7) L-ラムノース  | + |
| 8) D-マンニトール | + |
| 9) ラフィノース   | - |

+は同化する、-は同化しない

## (4) 細胞壁成分の性状

細胞を加水分解したものをセルロースの薄層クロマトグラフィーによって分析したところ、本菌の細胞壁成分のジアミノピメリン酸(diamino pimelic acid)の異性体型はL型であった。

【0024】本発明者らは、本菌をストレプトミセス・エスピー・エムイーアール・88(Streptomyces sp. Mer-88)として平成10年5月29日付で工業技術院微生物工業技術研究所に寄託し、FERMP-16829の受託番号で保管されている。

【0025】ベンゾピラン誘導体を生産するために、ストレプトミセス・エスピー・エムイーアール・88(以下、Mer-88菌株ともいう)を培養するには、ストレプトミセス属の微生物の培養により各種代謝物を生産するのに常用されている条件を広く使用することができる。限定されるものでないが、ベンゾピラン誘導体は上記微生物を栄養培地に接種し、好氣的に培養することにより製造することができる。上記微生物の培養方法は、原則的には一般の微生物の培養方法に準ずるが、通常は液体培養による振とう培養、通気攪拌培養などの好

氣的条件下で行うのが好適である。

【0026】培養に用いられる培地としてはストレプトミセス(Streptomyces)属に属する微生物が利用できる栄養源を含有する培地であればよく、各種の合成培地、半合成培地、天然培地などいずれも用いることができる。培地組成としては炭素源としてのグルコース、シュクロース、フルクトース、グリセリン、デキストリン、スターチ、糖蜜などを単独または組合わせて用いることができる。

【0027】窒素源としてはファーマメディア、ペプトン、肉エキス、大豆粉、カゼイン、アミノ酸、酵母エキス、尿素などの有機窒素源、硝酸ナトリウム、硫酸アンモニウムなどの無機窒素源を、単独または組合わせて用いることができる。その他、塩化ナトリウム、塩化カリウム、炭酸カルシウム、硫酸マグネシウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、塩化コバルトなどの塩類、ビタミンB、ビオチンなどのビタミン類も必要に応じて添加することができる。なお、培養中に発泡が著しいときは公知の各種消泡剤を適宜培地中に添加することもできる。

【0028】培養温度は通常、25~30℃で、ベンゾピラン誘導体の培養物中での蓄積が適当な濃度になるまで、通常、3~5日間培養する。得られる培養物からの該誘導体の回収は、溶媒抽出、各種クロマトグラフィー処理、結晶化等を、必要により組み合わせて行うことができる。得られたベンゾピラン誘導体は、その分子中のカルボキシル基を介して、それ自体既知の塩形成反応またはエステル化反応により、上記の塩またはエステルとすることができる。

【0029】こうして得られるベンゾピラン誘導体は、後述するごとく用量依存的に優れたICAM-1/LFA-1結合阻害活性を有するにもかかわらず、1000μg/mlの高用量で細胞障害作用を示さない。したがって、ICAM-1/LFA-1接着経路が関与する疾患、或いはICAM-1/LFA-1結合形成に随伴する疾患の予防または治療に有用である。

【0030】かような疾患としては、上述の抗ICAM-1抗体によるICAM-1/LFA-1経路に依存した接着を阻害することを意図した各種疾患モデル動物での知見に照らして、次のものを代表例として挙げる事ができる。すなわち、本発明で、予防または治療が強く意図されている疾患としては、慢性関節リウマチ等の関節炎(文献9参照)、心筋の虚血再灌流障害(文献6~8参照)、気管支喘息(文献10参照)、糸球体腎炎(文献3、4参照)、臓器移植時の拒絶反応(文献12、13参照)等を挙げることができ、上記文献の内容は引用することにより本明細書の内容となる。

【0031】ベンゾピラン誘導体またはそのエステル誘導体を初めとする本発明の化合物の上記疾患に対する投与量は、患者の年齢、性別、症状等により異なるが、成

(5) 開2000-72766 (P2000-7274

人一日当たり20mg~1g、好ましくは200mg~600mgの範囲とするのが好ましい、この場合、一日量を一日1回、あるいは2~4回に分けて投与すればよく、また一日量は必要によっては上記の量を超えてもよい。

【0032】ベンゾピラン誘導体またはそのエステル誘導体を初めとする本発明の化合物を含有する医薬は、その投与法、剤型に特に制限はなく、通常用いられている各種製剤の調製法にてその投与法にあった剤型にすればよい。

【0033】経口用製剤としては例えば、錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤や、溶液剤、シロップ剤、エリキシル剤または油性もしくは水性の懸濁液剤等を挙げることができる。

【0034】注射剤としては溶液を容器に収納後、凍結乾燥等によって固形製剤として用時調製の製剤としても良く、必要に応じて安定剤、防腐剤、溶解補助剤を使用してもよい。また一般用量毎に容器に収納してもよく、また多投与量を同一の容器に収納してもよい。

【0035】また外用製剤として溶液剤、懸濁液、乳濁液、軟膏、ゲル、クリーム、ローション、スプレー等が挙げられる。

【0036】固形製剤として活性化合物とともに製剤学上許容されている添加物を含み、例えば充填剤類や増量剤類、結合剤類、崩壊剤類、溶解促進剤類、湿潤剤類、潤滑剤類等を必要に応じて選択して混合し、製剤化することができる。

【0037】液体製剤としては溶液、懸濁液、乳液剤等を挙げることができ、添加剤として懸濁化剤、乳化剤等を含んでいてもよい。

【0038】

【実施例】次に、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0039】製造例：下記C培地20ml/250mlフラスコにMer-88菌株(FERMP-16829)を1白金耳で接種し、28℃で72時間振盪培養したのち、この培養液をC培地50ml/500mlフラスコに1フラスコあたり0.5ml植菌して28℃で96時間振盪培養した。

【0040】C培地1Lあたりの成分

ポテト澱粉	20g
グルコース	20g
エスサンミート	20g
酵母エキス	5g
NaCl	2.5g
CaCO <sub>3</sub>	3.2g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	5μg
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	5μg
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5μg

(pH7.4に調整したのち120℃、15分間オートクレープ)

得られた培養液3.4Lを3,000g×20分遠心分離した。上澄液を5N塩酸でpH2.0に調整し、1/2容の酢酸エチルで抽出した。この酢酸エチル層に等量の蒸留水を加え5N水酸化ナトリウムによりpH8.0として、分配を行った。こうして得られた水層をとり、1/2容の酢酸エチルを加えて5N塩酸でpH2.0に調整し、抽出した上層を減圧乾固して、以下の精製に供した。

【0041】シリカゲルクロマトグラフィー(Marc k社、Kiesel gel-60を40g使用)に上記粗製物を供し、1)クロロホルム：メタノール=20:1に酢酸0.1%を添加、2)クロロホルム：メタノール=10:1に酢酸0.1%を添加、3)クロロホルム：メタノール=5:1に酢酸0.1%を添加、4)クロロホルム：メタノール=3:1に酢酸0.1%を添加、を順に移動相として展開した(1~3は200ml、4は400ml)。活性を示した画分を集め、さらに逆相クロマトグラフィーにより精製を行った。ジエールサイエンス社製Inertsil ODS-3(30mmI.D.×250mm)を担体として、室温で33%アセトニトリル、0.1%TFAを移動相に用いて30ml/minで展開を行った。このとき、210nmでモニターを行ったが、50分前後に溶出されたピークに活性が観察された。この部分を集めて、セファデックスLH-20(ファルマシア社)110mlカラムでメタノールによりゲル透過クロマトグラフィーを行った。活性を示す部分を集めて減圧濃縮し、精製物13.7mgを得た。

【0042】上記精製物(ベンゾピラン誘導体)の物理化学的性質は、次のとおりであった。

【0043】

- A. 形状 無色、不定形
- B. 分子量および分子式 391.46 C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>N O<sub>5</sub>
- C. 融点 86-88℃
- D. 旋光度 [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> +43.6° (c 0.30 メタノール)
- E. 紫外吸収スペクトルにおける主要吸収帯(KBr錠剤中) 3866、3383、2976、2932、1730、1640、1611、1578、1539、1491、1422、1379、1321、1265、1200、1157、1113、1082、1016、952、897、833、767、667 cm<sup>-1</sup>
- F. 紫外吸収スペクトル λ<sub>max</sub>(メタノール) nm (ε) 259(14,692)、206(31,144)
- G. <sup>13</sup>C-NMRスペクトル(100MHz, CD<sub>3</sub>O

(6) 開2000-72766 (P2000-7274

D)

178.3 s, 169.7 s, 157.9 s, 132.5 s, 130.8 d, 128.1 d, 126.8 s, 125.4 d, 121.4 s, 118.0 d, 80.5 s, 69.3 d, 68.3 d, 60.8 d, 38.9 t, 32.0 t, 25.9 q, 22.6 t, 20.1 q, 18.9 q, 17.7 q (ppm from TMS)

<sup>1</sup>H-NMRスペクトル (400MHz, CD<sub>3</sub>O D)

7.67 (1H, s), 7.66 (1H, d), 6.83 (1H, d), 5.13 (1H, t), 4.63 (1H, d), 4.41 (1H, dq), 3.88 (1H, dd), 3.07 (1H, dd), 2.81 (1H, d), 2.16 (2H, m), 1.66 (3H, s), 1.66 (2H, m), 1.60 (3H, s), 1.26 (3H, s), 1.21 (3H, d), (ppm from TMS)

1. Rf値: 0.21 (Silica gel TLC Merck 105715, CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH=5:1, 酢酸0.1%)

(以上の物理化学的データに基づき、上記で得られた化合物の構造は式(1)のごとく同定された。)

細胞接着試験: ICAM-1蛋白としては、ICAM-1蛋白のうちのドメインのうち、LFA-1蛋白との結合に必要であるN末端側の2つのドメインをヒトIgG-Fc部分と融合させた蛋白(以下、D1D2-IgGという)を用いた。また結合させる細胞としては、ヒト

T白血病細胞株SKW3(以下、SKW3という)を用いた。D1D2-IgGをTSM緩衝液(以下、トリス緩衝液という、組成: 25mM Tris HCl (pH7.8), 2mM MgCl<sub>2</sub>, 150mM NaCl)で0.8μg/mlに希釈後、96穴平底マイクロプレート(住友ベークライト社製)の各穴に50μlずつ添加し、4℃で一晩放置して固相化した。翌日2% BSA(ウシ血清アルブミン)含有トリス緩衝液を200μlずつ加え、37℃で5時間インキュベートすることによりブロッッキングを行った。マイクロプレートの各穴を牛胎仔血清を10%含むRPMI1640培地(日研生物医学研究所製)で1回洗浄した後、同培地で調整した化合物Mer-88溶液(ジメチルスルフォキシドを1%含む)50μlを添加し、直ちにSKW3細胞懸濁液50μlを加え37℃で30分間反応させ接着させた。

【0044】ここで、SKW3細胞はあらかじめ蛍光色素であるBCECF-AM (3'-O-Acetyl-2', 7'-bis(carboxyethyl)-4 or 5-carboxyfluorescein Diacetoxymethyl Ester, 同位化学社製)で標識したものをを用いた。すなわち、1×1

07個のSKW3細胞当たり10μMのBCECF-AMを添加し37℃で1時間標識した。標識後SKW3細胞を20ng/mlのPMA (phorbol myristate acetate)で37℃30分間処理し、細胞上のLFA-1分子を活性化させた。洗浄後、牛胎仔血清を10%含むRPMI1640培地に6×10<sup>6</sup>/mlとなるように懸濁し接着試験に用いた。

【0045】反応終了後、37℃に温めた牛胎仔血清を10%含むRPMI1640培地でマイクロプレートの各穴を満たし、プレートシール(住友ベークライト社製)でマイクロプレートの上面をシールした後、プレートの上下を逆にして25℃で30分静置後、非接着細胞を吸引除去した。マイクロプレートの各穴に0.1%のNP40 (Nonidet P40)を100μl加えて細胞を溶解し、蛍光リーダー (Fluorescan IIタイターテック社製)により励起波長485nm、測定波長538nmで蛍光を測定し、薬物添加および非添加の蛍光強度から抑制率を求めた。

【0046】本発明に係るベンゾピラン誘導体は、下記表1に示されるように31μg/mlから用量依存的にICAM-1/LFA-1結合阻害作用を示し、1000μg/mlで38.4%の結合阻害を示した。また、化合物Mer-88は、1000μg/mlで細胞障害作用を示さなかった。

【0047】

【表1】

表1: ベンゾピラン誘導体の接着阻害作用

Mer-88 (μg/ml)	抑制率±SD (%)
1000	38.4 ± 27.5
250	24.5 ± 19.3
125	25.9 ± 24.4
63	25.5 ± 13.8
31	20.4 ± 9.0
15	0.3 ± 5.4

【0048】D1D2-IgG/mLFA-1結合試験: ICAM-1蛋白としては、前記のD1D2-IgGを用い、LFA-1蛋白としては、膜結合性のmLFA-1を用いた。D1D2-IgGをトリス緩衝液で4μg/mlに希釈後、96穴平底マイクロプレート(コースター社製)の各穴に50μlずつ添加し、4℃で一晩放置して固相化した。翌日2%BSA含有トリス緩衝液を200μlずつ加え、室温で2時間インキュベートすることによりブロッッキングを行った。マイクロプレートの各穴を洗浄用緩衝液(組成: 0.05% Tween 20/TSM)で1回洗浄した後、希釈用緩衝液(組成: 1%BSA, 0.05% Tween 20/TSM)で8μl/mlに調整したmLFA-1を25μlとべ

(7) 開2000-72766 (P2000-7274)

ンゾピラン誘導体溶液を25 $\mu$ l添加し、室温で1時間反応させ接着させた。マイクロプレートの各穴を洗浄用緩衝液で3回洗浄した後、希釈用緩衝液で1 $\mu$ g/mlに調製したビオチン化抗LFA-1抗体TS2/4を50 $\mu$ lずつ添加し、室温で1時間反応させた。マイクロプレートの各穴を洗浄用緩衝液で3回洗浄した後、希釈用緩衝液で10000倍に希釈したHRP (Horse radish peroxidase) 標識アビジン (ザイメット社) を50 $\mu$ lずつ添加し、室温で1時間反応させた。マイクロプレートの各穴を洗浄用緩衝液で3回洗浄した後、ABTS (2, 2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline

-6-sulfonic acid)) ペルオキシダーゼ基質を100 $\mu$ lずつ添加し、室温で15分反応させた後、1% SDSを50 $\mu$ l加えて反応を停止させ、吸光度リーダーにより405nmの特異吸収を測定し、薬物添加及び非添加反応液の吸光度から抑制率を求めた。

【0049】ベンゾピラン誘導体は、下記表Xに示されるように313 $\mu$ g/mlから用量依存的にICAM-1/mLFA-1結合阻害作用を示し、2500 $\mu$ g/mlで91.7%の結合阻害を示した。

【0050】測定結果を下記表2に示す。

【0051】

【表2】

表2: ベンゾピラン誘導体のICAM-1/mLFA-1の結合阻害作用

重量濃度 ( $\mu$ g/ml)	濃度 (mM)	結合阻害率 (%)
5,000	12.8	92.3
2,500	6.4	91.7
1,250	3.2	76.7
625	1.6	59.0
313	0.8	35.6

【0052】

【発明の効果】本発明に係るベンゾピラン誘導体は、ICAM-1/LFA-1結合形成を有意に阻害する作用を有し、ICAM-1/LFA-1結合形成に伴伴する各種疾患の予防または治療に有用である。

【0053】(引用する文献の一覧)

1. Barton RW, et al: J. Immunol. 143: 1278-1282, 1989
2. Mulligan MS, et al: J. Immunol. 150: 2407-2417, 1993
3. Mulligan MS, et al: J. Immunol. 150: 2401-2406, 1993
4. Nishikawa K, et al: J. Exp. Med. 177: 667-677, 1993
5. Kelly KJ, et al: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 812-816, 1994
6. Seko Y, et al: J. Clin. Invest. 91: 1327-1336, 1993

vest. 91:1327-1336, 1993

7. Kuikela GL, et al: J. Clin. Invest. 92: 1504-1516, 1993

8. Yamazaki T, et al: Am. J. Pathol. 143: 410-418, 1993

9. Iigo Y, et al: J. Immunol. 147: 4167-4171, 1991

10. Wegner CD, et al: Science 247: 456-459, 1990

11. Wallace JL, et al: Am. J. Physiol. 265: G993-G998, 1993

12. Cosimi AB, et al: J. Immunol. 144: 4604-4612, 1990

13. Isobe M, et al: Science 255: 1125-1127, 1992

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

A61K 31/35

識別記号

ACV

AED

F I

A61K 31/35

特許請求の範囲 (参考)

ACV

AED

C12N 1/20

C12P 17/06

C12N 1/20

C12P 17/06

A

//(C12N 1/20

C12R 1:465)



(8) 開2000-72766 (P2000-7274

(C12P 17/06

C12R 1:465)

(72) 発明者 渡辺 吉雄

神奈川県藤沢市藤が岡2-22 3

(72) 発明者 上橋 和之

神奈川県秦野市南が丘3丁目4の1 5-204

(72) 発明者 高子 徹

東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第  
一製薬株式会社東京研究開発センター内

Fターム(参考) 4B064 A646 BA04 BC01 B601 BH01

BH02 BH04 BH06 BJ01 BJ02

BJ04 BJ09 BJ11 CA03 CF07

DA03

4B065 A450X AC14 AC15 BA22

BB18 BD16 CA18 CA34 CA44

4C062 FF13

4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 BA08

MA01 MA04 NA14 ZA36 ZA59

ZB01 ZB08 ZB11 ZB15 ZC02